Dr F.BOUBRIT
Maitre assistante en microbiologie
Faculté de médecine ; laboratoire de microbiologie

EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE AU COURS DES INFECTIONS DIGESTIVES

COPROCULTURE

I. Introduction :

Les infections digestives se manifestent par divers syndromes fréquemment regroupés sous le terme de diarrhées infectieuses aigues. Ces infections représentent l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, leur gravité est surtout liée aux pertes hydro-électrolytiques qui les accompagnent.
L'examen bactériologique des selles se fait par coproculture, c'est-à-dire par ensemencement des selles sur des milieux de culture appropriés. Le but est de rechercher parmi une flore commensale très abondante soit des bactéries habituellement absentes et réputées pour leur pouvoir pathogène, soit une espèce bactérienne anormalement prédominante.
Les indications de la coproculture sont triples :
- la recherche de la cause infectieuse d'une diarrhée, qui est la plus fréquente,
- le dépistage des porteurs sains pour les métiers de l'alimentation,
- les enquêtes épidémiologiques.

II. Physiopathologie des infections digestives :

1-Eau et intestin : la muqueuse de l'intestin est essentiellement constituée d'entérocytes (dont le rôle est l'absorption des nutriments), l'intestin est capable d'absorber ou de secréter de l'eau et des électrolytes(Na+, Cl-, K+, HCO-), la diarrhée est le résultat soit :

- D'une diminution de l'absorption (destruction des entérocytes)
- D'une augmentation de la sécrétion d'eau (diarrhée osmotique entérotoxine)

La perte d'eau, au cours des diarrhées, aboutit très vite, si elle n'est pas compensée, à une déshydratation qui fait toute la gravité de ce syndrome.

2-Les bactéries intestinales : L'intestin de l'homme est dês sa naissance colonisé par de nombreuses espèces bactériennes, la plupart sont des bactéries commensales et certaines sont indispensables au bon fonctionnement de l'appareil digestif. Certaine espèces bactériennes sont capables de déclencher des maladies intestinales quand elles s'y prolifèrent. Il s'agit surtout de bactéries de genre : Salmonella, Shigella, Escherichia coli (certains serotypes), Yersinia, Vibrio et Campylobacter ;dans certain cas Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, et Claustridium perfringens.

Ces bactéries sont dites pathogènes et sont regroupée en 3 types selon la physiopathologie des maladies provoquées :

a. Bactéries entérotoxinogènes : elles se multiplient dans les parties hautes de l'intestin (duodénum, jéjunum), n'altèrent pas la muqueuse et provoquent une diarrhée aqueuse, non fébrile sans émission de sang ou de leucocytes, sa gravité est liée à la déshydratation qu'elle provoque par la fuite importante d'eau et d'électrolytes. Dans ce groupe on trouve : Vibrio cholerae, Vibrio parhaemolyticus, Aeromonas hydrophyla, Escherichia coli entérotoxinogène (E.C.E.T).

b. Bactéries entéro-invasive : capable d'envahir la muqueuse intestinale et la détruire causant une desquamation da la muqueuse avec une intense réaction inflammatoire. Ces bactéries se multiplient dans les parties basses de l'intestin (iléon, colon) et provoquent des dysenteries càd émission fréquentes de selle sanglantes et purulentes avec une fièvre. Dans ce groupe on trouve : Shigella, Escherichia coli entéro-invasive(EIEC)

Salmonella, Yersinia et Campylobacter envahissent les cellules intestinales sans les détruire, elle pénètre dans la sous muqueuse pour envahir les formation lymphoïdes (plaques de Peyer et ganglions mésentériques)

c. Bactéries entéro-pathogènes : le mécanisme n'est pas parfaitement connu, dans ce groupe on trouve : Eshcerichia coli entéro-pathogène (E.P.E.C) responsable des gastroentérites infantiles de moins de deux ans. Certaines bactéries sont entéropathogènes dans des circonstances particulières :
-S.aureus et Bacillus cereus qui secrètent leur toxine dans l'aliment contaminé
-Microorganismes entéropathogène à la faveur d'un déséquilibre de la flore intestinale (diarrhée post antibiothérapie) :Clostridium difficile.

III. Diagnostic bactériologique :

1-Le prélèvement :

Les selles sont émises dans un récipient propre, chez le nourrisson il est possible de procéder à un écouvillonnage rectal pour prélever les selles.

L'acheminement vers le laboratoire doit être rapide sinon conserver le prélèvement à +4°c, dans le cas ou le temps d'acheminement est trop long employer un milieu de transport

La **fiche de renseignement correctement remplie** doit accompagner le prélèvement comportant le nom le prénom, l'âge, les signes cliniques, notion de voyage récent, de prise d'antibiotiques et tout renseignement permettant une orientation diagnostique.

2-Conduite de l'examen cytobactériologique :

a-Examen macroscopique : la selle peut être normal moulée, molle ou liquide, diarrhéique : soit afécale avec glaires sanglantes soit incolore ou eau de riz.

b-Examen microscopique :

-Examen direct à l'état frais : permet d'apprécier un déséquilibre de la flore. A l'état normal on trouve environ 4/5 de bacilles et 1/5 de cocci avec de rares levures. Un processus invasif est caractérisé par la présence d'hématies et de leucocytes.

-Coloration au bleu de méthylène

-Coloration de Gram : 60 à 70% de bactérie à Gram négatif 30 à 40% Gram positif

c-Ensemencement-identification :

➷ ***Salmonella – Shigella :***

- Milieux d'isolement : Des milieux solides d'isolement pour entérobactéries doivent être ensemencés, soit le milieu Salmonella - Shigella (SS) soit le milieu Hektoen. Le milieu Hektoen est recommandé car il est mieux adapté à la culture des *Shigella* et plus discriminant. Ces milieux contiennent des inhibiteurs des bactéries à Gram positif et des Proteus. Ils contiennent aussi des sucres et des indicateurs colorés d'acidification, permettant une orientation sur la nature des bactéries en fonction de leurs capacités à métaboliser ces sucres.
- Milieux d'enrichissement : En même temps, pour les Salmonelles, un enrichissement doit être effectué dans un milieu liquide contenant des inhibiteurs des autres entérobactéries. Les deux milieux les plus utilisés sont le milieu de Muller Kauffmann qui contient des sels biliaires, du tétrathionate et du vert brillant, ou le milieu de Leifson qui contient du sélénite de sodium. Après 24 heures, le contenu de ce milieu est repiqué sur gélose Hektoen.

L'incubation de tous les milieux se fait à 37° C pendant 18 à 24 heures.

- Identification biochimique :

-Pour *Salmonella* et *Shigella* : prendre les colonies lac(-) H_2S(-) et lac(-) H_2S(+)
Repiquer au moins 4 colonies sur milieu urée-indole. Incuber à 35-37°C au bain-marie pendant 4 heures.
Uréase (+) : *Proteus*
Uréase (-): ensemencer à partir de chaque milieu un TSI et LDC + témoin.
Incubation à 35-37°C pendant une nuit.
.Si urée(-) TDA (-) LDC(+) : *Salmonella* (si gaz+, H_2S+ : mineure ou para B)
(si gaz+, H_2S- : para A)
(si gaz-) H_2S - ou + : typhi)
.Si urée -, TDA -, LDC - : Shigella (gaz -, H_2S -, lact et sacch -).

Au cas où le diagnostic biochimique conduit à l'identification de Salmonella ou de *Shigella,* il doit être confirmé par l'identification antigénique.

- Identification antigénique :

Pour les Salmonella qui comportent plus de 2000 sérotypes, on peut utiliser les sérums OMA et OMB qui sont des mélanges d'agglutinines anti O des principaux groupes rencontrés en pathologie humaine, l'identification est poursuivie avec les sérums anti O monovalents.

Pour les *Shigella,* il existe quatre sérums pour l'identification antigénique : sérum anti Shigella dysenteriae, anti Shigelle flexneri, anti Shigelle sonnei et anti Shigella boydii.

↳ ***Escherichia coli* entéropathogène :**

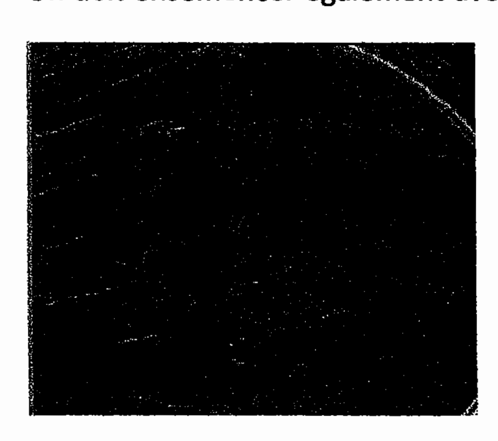
Recherchée Chez les enfants de moins de 2 ans

A partir des boites de BCP, repiquer 8 à 10 colonies sur milieu urée-indole et sur TSI, Incuber à 37°c pendant 24h.Les colonie Indole+, urée-,avec gaz et sucre positifs sur TSI : identification antigénique à l'aide de sérum anti EPEC.

↳ ***Vibrio cholerae :***

- Enrichissement : L'ensemencement se fait à partir des selles : un tube d'eau peptonée alcaline est utilisé comme milieu d'enrichissement. Il faut ensuite incuber pendant 3 à 6 heures à 37° C, puis prélever une dose de la culture en surface et ensemencer un second tube d'eau peptonée alcaline, ainsi qu'un milieu sélectif gélosé TCBS (thiosulfatecitrate-bile-sacharose) ou GNAB(gélose nutritivealcaline biliée) et les incuber une nuit à 35° C.

On doit ensemencer également avec les selles un milieu gélosé et l'incuber une nuit à 35° C.



GNAB : colonies rondes, taille moyenne (2mm), translucides, bleutées, à bords réguliers (18 h)

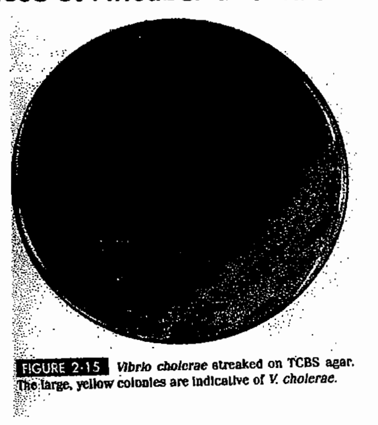


FIGURE 2-15 *Vibrio cholerae* streaked on TCBS agar. The large, yellow colonies are indicative of *V. cholerae.*

TCBS : les colonies arrondies, bombées, saccharose (+)(jaunes)

L'identification est faite par les caractères biochimiques (galerie API 20 E), et par agglutination avec les sérums anti-*Vibrio cholerae* anti O_1 et anti O_{139}, à partir de colonies repiquées sur gélose nutritive.

Pour la détermination de la sensibilité au composé vibriostatique 0/129, ensemencer un milieu gélosé Mueller-Hinton sur toute la surface de la boîte et déposer un disque de composé. Après 24 heures à 37° C la croissance de *Vibrio cholerae* est inhibée (diamètre ≥ 15 mm).

➭ ***Campylobacter jejuni :***

La recherche est systématiquement réalisée chez les enfants et pour les adultes sur demande spéciale ou en présence de selles liquides.

La culture se fait sur un milieu spécifique (milieu de Skirrow ou de Butzler). Les cultures sont incubées pendant 48 heures minimum en micro-aérophilie.

➭ ***Yersinia enterocolitica :***

Cette recherche n'est pratiquée que chez les enfants dont les selles sont diarrhéiques ou les adultes dans un contexte de polyarthrite réactionnelle.

A partir de la suspension de selle, effectuer un isolement sur : **Hektoen** ou sur milieu spécifique pour Yersinia : **milieu à l'Irgasan-cefsulodine et novobiocine (CIN)** incubé pendant 48 h à 28 -30 °C de préférence sinon à 37°(rarement positive)

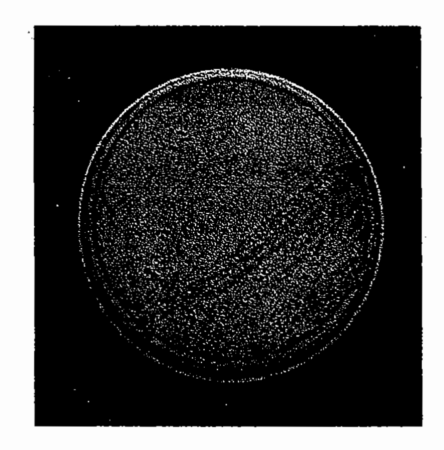
Et un enrichissement sur **milieu de Rappaport modifié** incubé pendant 3 semaines à +4°C en faisant des repiquages toutes les semaines.

- Identification :

Sur CIN,*Yersinia* donne de petites colonies de 1 mm de diamètre, à centre rouge entourées d'une zone translucide.

A 48 h, colonies facilement visibles (zone de précipitation due aux sels biliaires)

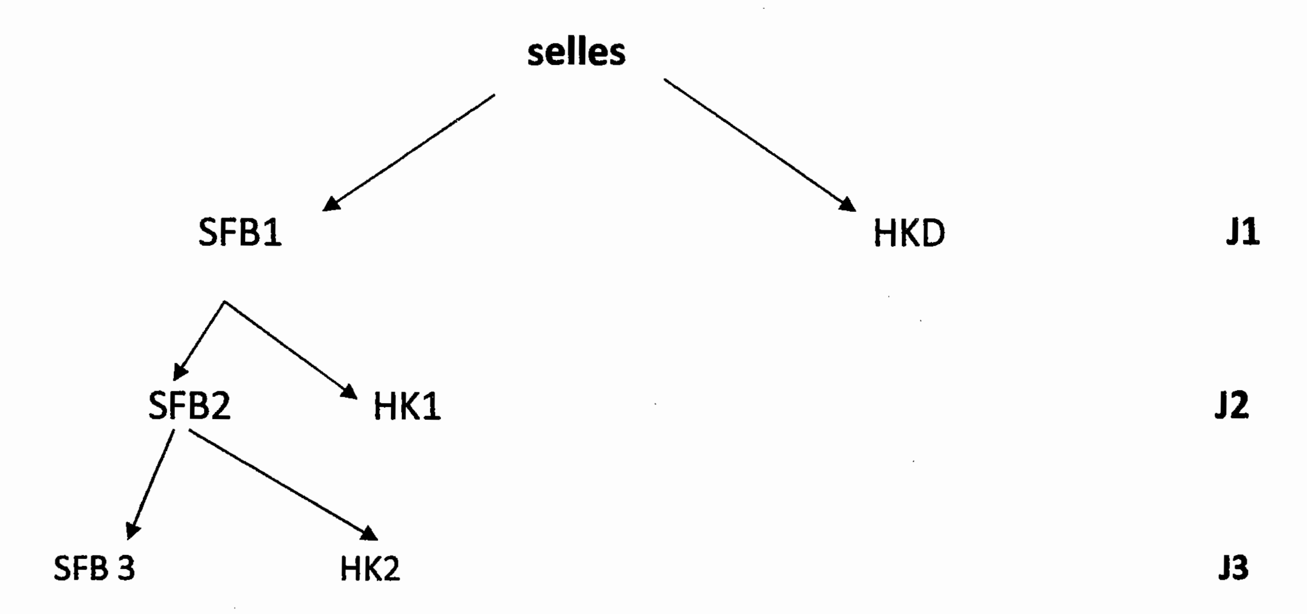
- Colonies rouges : mannitol +
- Colonies jaunes : mannitol –



d. Antibiogramme :

L'antibiogramme doit être systématique mais ne doit pas inciter à une antibiothérapie (antibiogramme donné à titre indicatif et non comme une incitation à une antibiothérapie)
Le traitement antibiotique n'est justifié qu'en cas de diarrhée très invasive avec selles sanglantes ou mucopurulente, chez les personnes ayant un déficit immunitaire ou en cas de prolongation anormale d'une diarrhée d'origine bactérienne.

Schéma général de la coproculture



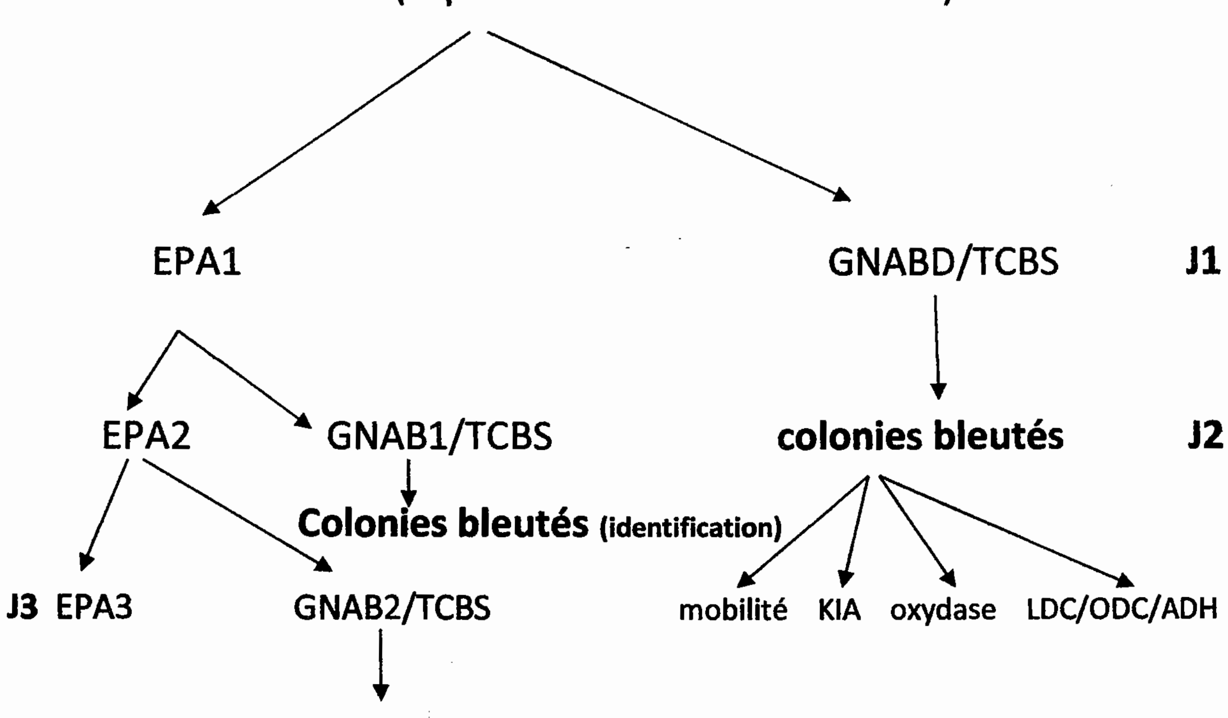
-Colonies suspectes :

Inferieur à 2ans :E coli, salmonella et shigella

Superieur à 2ans :salmonella et shigella

Vibrio cholera

Selles (aqueuses en cas de cholera)



Colonies bleutés (identification)